

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 juillet 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/064340 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/569, 33/543

GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/003364

(22) Date de dépôt international :
23 décembre 2004 (23.12.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0315327 24 décembre 2003 (24.12.2003) FR
0408600 3 août 2004 (03.08.2004) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-ODIAG [FR/FR]; 27, boulevard Jean Moulin, F-13005 Marseille (FR).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : ESCAR-GUEL, Claude [FR/FR]; 11, place du Coquillon, F-83110 Sanary-sur-Mer (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avec revendications modifiées et déclaration

(74) Mandataire : DOMANGE, Maxime; Cabinet Beau de Loménie, 232, avenue du Prado, F-13295 Marseille Cedex 08 (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 24 novembre 2005

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

Date de publication des revendications modifiées et de la déclaration: 12 janvier 2006

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS AND DETERMINATION OF IMMUNISATION STATUS, COMPRISING VARIOUS CONTROLS

(54) Titre : METHODE DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE ET DETERMINATION DE STATUT VACCINAL COMPRENANT DIFFERENTS CONTROLES

WO 2005/064340 A3

(57) Abstract: The invention relates to a method for serological diagnosis by means of indirect immunofluorescence, including the systematic control of the presence of rhumatoid factors and anti-nuclear antibodies in the serum of a patient, and the control of the presence and reactivity of the secondary detection antibodies anti IgM and anti IgG used. According to the invention, a plurality of corpuscular microbial antigens and control antigens comprising non-specific immunoglobulins IgG and IgM and nucleated cells are deposited by a robot and fixed on the solid support by means of physical adsorption. The invention also relates to a method for determining the immunisation status of an individual by dosing the specific IgG type antibodies of vaccine-associated antigens, for a plurality of vaccine-associated antigens, according to the inventive diagnostic method.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une méthode de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte, comprenant le contrôle systématique de la présence de facteurs rhumatoïdes et d'anticorps antinucléaires dans un sérum de patient, ainsi que le contrôle de la présence et réactivité des anticorps secondaires de détection anti IgM et anti IgG mis en oeuvre. Selon la présente invention, une pluralité d'antigènes microbien corpusculaires et d'antigènes de contrôle comprenant des immunoglobulines non spécifiques IgG et IgM et des cellules nucléées, sont déposés par un robot et fixés par adsorption physique sur ledit support solide. La présente invention concerne également une méthode de détermination du statut vaccinal d'un individu par dosage des anticorps de type IgG spécifiques d'antigènes vaccinaux et ce pour une pluralité d'antigènes vaccinaux, selon la méthode de diagnostic selon la présente invention.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau international le 17 novembre 2005 (17.11.2005);
revendications originales 1-34, revendications modifiées 1-34].

+ DECLARATION**REVENDICATIONS**

1. Méthode de diagnostic sérologique *in vitro* d'agent microbien par immunodétection dans laquelle on détecte la présence et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobulines de patient des deux classes M et G ou seulement de la classe G spécifiques d'un antigène microbien caractéristique dudit agent microbien, dans un échantillon de sérum du patient à tester, par détection et quantification d'un complexe de réaction immunologique entre ledit antigène microbien à détecter et une dite immunoglobuline spécifique de classe M pour le dosage d'IgM, et/ou 5 respectivement une dite immunoglobuline spécifique de classe G pour le dosage d'IgG, à l'aide d'une première substance de détection et/ou respectivement seconde substance de détection constituée par un anticorps ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe M et/ou respectivement G, caractérisée en ce que :

15 1/- on réalise les étapes dans lesquelles :

■ on met en contact ledit échantillon de sérum à tester avec lesdites première et seconde substances de détection ou seulement ladite seconde substance de détection et au moins un support solide sur lequel ont été fixés les antigènes suivants :

20 - un premier antigène de contrôle constitué par une immunoglobuline non spécifique de classe G de l'espèce du patient, et

- un deuxième antigène de contrôle comprenant des complexes ADN/histones, et

25 - le cas échéant, un troisième antigène de contrôle constitué par une immunoglobuline non spécifique de classe M de l'espèce du patient; la présence dudit troisième antigène de contrôle étant nécessaire en cas de dosage d'IgM, et

- au moins un dit antigène microbien, et

■ on réalise une série de contrôles comprenant:

a- le contrôle de la réactivité de ladite deuxième substance de détection en vérifiant si ledit premier antigène de contrôle réagit avec ladite deuxième substance de détection, et le cas échéant le contrôle de la 5 présence de facteurs rhumatoïdes dans ledit échantillon de sérum en vérifiant si le premier antigène de contrôle réagit avec ledit échantillon de sérum et ladite première substance de détection, en cas de dosage d'IgM,

10 b- le contrôle de la présence d'anticorps antinucléaires dans ledit échantillon de sérum à tester en vérifiant si ledit deuxième antigène de contrôle réagit avec ledit échantillon de sérum et la seconde substance de détection,

c- le contrôle de la réactivité de ladite première substance de détection en vérifiant si ledit troisième antigène de contrôle réagit avec ladite première substance de détection, en cas de dosage d'IgM, et

15 d- le contrôle de la présence d'un sérum humain dans l'échantillon à tester, et

20 2/- on ne prend en compte le résultat d'une réaction entre ledit antigène microbien, ledit échantillon de sérum et une dite substance de détection que si le contrôle de la présence d'un sérum humain est positif et si les conditions cumulatives suivantes sont réunies:

a- ledit premier antigène de contrôle réagit avec ladite deuxième substance de détection,

b- ledit deuxième antigène de contrôle ne réagit pas, et

25 c- le cas échéant, si ledit troisième antigène de contrôle réagit avec ladite première substance de détection, en cas de dosage d'IgM.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'on utilise un unique support solide mis en contact avec le cas échéant simultanément desdites première et seconde substances de détection

comportant un premier et respectivement un second élément de marquage, le second élément de marquage émettant un signal différent du premier élément de marquage, lesdites première et seconde substances de détection comprenant un premier et respectivement un second anticorps ne réagissant qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe M et respectivement de classe G.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'on contrôle que ledit échantillon testé contient bien un sérum de l'espèce du patient en détectant si des immunoglobulines de l'espèce du patient réagissent avec un quatrième antigène de contrôle contenant la protéine A d'une bactérie *Staphylococcus aureus*, de préférence ledit quatrième antigène étant une bactérie *Staphylococcus* entière, en mettant en contact ledit échantillon avec un support solide sur lequel est fixé un dit quatrième antigène de contrôle, en présence de ladite seconde substance de détection qui est un anticorps anti-immunoglobuline de l'espèce du patient et ne réagissant pas avec ledit quatrième antigène de contrôle, le contrôle de la présence d'un sérum est positif si ledit quatrième antigène réagit avec ledit échantillon de sérum et ladite seconde substance de détection.

4. Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite seconde substance de détection, est une immunoglobuline animale, de préférence une immunoglobuline de chèvre ou de poulet.

5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que, le cas échéant, les deux dites première et seconde substances de détection sont des immunoglobulines de chèvre ou de poulet, respectivement anti- IgM et anti- IgG.

6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit deuxième antigène de contrôle est constitué de cellules de fibroblastes humains non confluentes en suspension.

7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que lesdits antigènes de contrôle et antigènes microbiens sont fixés sur support solide par adsorption physique.

8. Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est un antigène corpusculaire constitué de microbe entier inactivé ou une fraction de microbe.

9. Méthode de diagnostic sérologique selon l'une des revendication 1 à 8, caractérisée en ce que ledit agent microbien est choisi parmi des micro-organismes comprenant une bactérie, un virus, un parasite ou un champignon.

10. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est une bactérie intracellulaire ou un virus.

11. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est choisi parmi les bactéries du genre *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*, *Tropheryma*, *Ehrlichia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Treponema*, *Borrelia*, et *Leptospira*.

12. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est une bactérie responsable d'une endocardite.

13. Méthode de diagnostic sérologique selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est un antigène viral choisi parmi les virus H.I.V., C.M.V. Epstein-Barr, Rougeole, Rubéole, virus des hépatites A et B.

25 14. Méthode selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que :

- on détecte et on dose la quantité des immunoglobulines de patients des deux classes M et G spécifiques d'un antigène microbien,

- au moins un dit antigène microbien et lesdits premier, deuxième et troisième et quatrième antigènes de contrôle sont fixés sur un même support solide et

5 - on utilise pour la détection des différents dits antigènes microbiens, les mêmes dites première et seconde substances de détection avec des éléments de marquage différents, lesdites première et deuxième substances de détection étant des immunoglobulines animales ne réagissant pas avec ledit quatrième antigène.

10 15. Méthode selon la revendication 1 à 14, caractérisée en ce que l'on utilise comme support solide une lame de verre ou en plastique, un tube de titrage ou un puits d'une plaque de microtitrage en plastique.

15 16. Méthode selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que l'on détecte et, le cas échéant, on quantifie la dose de dite immunoglobuline de l'espèce du patient spécifique du dit antigène microbien dans l'échantillon à tester, et les réactions immunologiques entre lesdits antigènes de contrôle et lesdites substances de détection, par lecture automatisée à l'aide d'un appareil de lecture d'un signal fluorescent d'une substance fluorescente correspondant aux éléments de marquage desdites substances de détection.

20 17. Méthode selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que ledit antigène microbien est un antigène vaccinal et ladite immunoglobuline spécifique du dit agent vaccinal à détecter est une immunoglobuline de classe G.

25 18. Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'on détermine le statut vaccinal d'un individu par détection et quantification des anticorps sériques IgG spécifiques d'antigènes vaccinaux d'une pluralité d'agents pathogènes du type bactéries, virus, champignons ou parasites, en réalisant la détection, et de préférence la quantification, d'un complexe de réactions immunologiques entre chaque dit antigène vaccinal et 30 respectivement chaque dit anticorps spécifique dudit antigène vaccinal,

éventuellement présent dans un échantillon de sérum humain à tester, comprenant:

1- la mise en contact d'un seul et même dit échantillon de sérum à tester avec :

5 - un même support solide sur lequel est fixé une pluralité de dits antigènes vaccinaux correspondant à une pluralité d'agents pathogènes, et lesdits premier, deuxième et de préférence quatrième antigènes de contrôle,

10 - en présence d'au moins une dite seconde substance de détection réagissant avec au moins un dit anticorps spécifique et ne réagissant pas avec l'un quelconque desdits antigènes vaccinaux, et

15 2- au moins un dit contrôle de la réactivité de ladite deuxième substance de détection à l'aide d'un dit premier antigène de contrôle et un dit contrôle de la présence d'anticorps antinucléaires à l'aide d'au moins un dit deuxième antigène de contrôle, et le contrôle de la présence d'un sérum humain dans ledit échantillon à tester.

19. Méthode selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'on détecte desdits anticorps spécifiques du type immunoglobulines IgG et on met en œuvre une dite deuxième substance de détection qui est une immunoglobuline anti-IgG, constituée d'une immunoglobuline de chèvre ou de poulet.

20. Méthode selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisée en ce que lesdits antigènes vaccinaux sont des antigènes des agents pathogènes choisis parmi les virus des oreillons, de la rubéole, de la rougeole, de la varicelle, de la poliomyélite, de la fièvre jaune, de l'encéphalite à tique, de l'hépatite A, de l'hépatite B, et les bactéries de la coqueluche *Bordetella pertussis*, du tétanos et de la diphtérie.

21. Méthode selon une des revendications 20 à 20, caractérisée en ce qu'on détermine si la concentration de dit anticorps spécifiques atteint

un seuil à partir duquel ledit anticorps spécifique a une action protectrice protégeant contre la maladie déterminée par le pathogène.

22. Méthode selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que l'on recueille un volume déterminé de sang total à l'aide d'un 5 tube capillaire dans un flacon contenant un volume déterminé d'un tampon permettant l'élution du sérum, le sérum étant alors dilué à une concentration déterminée, de préférence de 1/100 à 1/20.

23. Méthode selon l'une des revendications 18 à 22, caractérisée en ce que, pour chaque détection et, le cas échéant, quantification d'un dit 10 antigène vaccinal, on réalise les mesures suivantes :

1- une première mesure d'une première valeur représentative de la quantité d'un premier élément de marquage, ladite première valeur étant la valeur de l'intensité d'un signal émis par ledit premier élément de marquage fluorescent, ledit premier élément de marquage se fixant de manière non 15 spécifique sur toute protéine dans la zone de dépôt dudit antigène vaccinal, et

2- une deuxième mesure d'une deuxième valeur représentative de la quantité d'un deuxième élément de marquage émettant un signal différent dudit premier élément de marquage, ladite deuxième valeur étant la valeur 20 de l'intensité du signal émis par ce deuxième élément de marquage fluorescent à une longueur d'onde d'excitation différente de celle dudit premier élément de marquage fluorescent, ledit deuxième élément de marquage étant l'élément de marquage de ladite seconde substance de détection dudit antigène vaccinal, dans la zone de dépôt dudit 25 antigène, et

3- on calcule le rapport desdites première et deuxième valeurs, et

4- on compare la valeur dudit rapport à celle d'un rapport de référence obtenu avec une collection de sérums de référence positifs et négatifs, permettant ainsi par comparaison de déterminer la nécessité ou

non de vacciner la personne pour ledit antigène vaccinal selon la valeur du rapport desdites première et deuxième valeurs.

24. Trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisée en ce qu'elle 5 comprend

- au moins un dit support solide sur lequel sont fixés au moins un dit antigène microbien et le(s) dit(s) antigène(s) de contrôle, lesdits antigènes de contrôle comprenant au moins lesdits premier et deuxième antigènes de contrôle et, le cas échéant, lesdits troisième et quatrième antigènes de 10 contrôle, et

- la (ou les) dite(s) substance(s) de détection et réactifs utiles pour la révélation des dits éléments de élément de marquage et le cas échéant desdits éléments de marquage.

25. Trousse selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle 15 comprend :

- un même dit support solide sur lequel sont fixés par adsorption physique au moins un dit antigène corpusculaire et les dits antigènes de contrôle, et

20 - l'une au moins d'une même dite première ou deuxième substance de détection pour détecter les différents antigènes microbiens.

26. Trousse selon la revendication 24 ou 25, caractérisée en ce qu'elle comprend un flacon comportant un volume déterminé d'un tampon d'élution pour le recueil d'un volume déterminé d'un échantillon de sérum à tester.

25 27. Méthode de préparation d'un support solide sur lequel est fixé au moins un antigène choisi parmi un dit antigène microbien, de préférence corpusculaire, un dit premier, un dit deuxième, le cas échéant un dit troisième, et un dit quatrième antigènes de contrôle permettant une

détection par lecture automatisée à l'aide d'une dite première et, le cas échéant, deuxième substance de détection, utile dans une méthode selon l'une des revendications 1 à 23 ou une trousse selon l'une des revendications 24 à 26, caractérisée en ce que l'on dépose de façon 5 robotisée lesdits antigènes microbiens, de préférence corpusculaires, et antigènes de contrôle avec un robot de dépôt comprenant de préférence une seringue, lesdits antigènes corpusculaires étant de préférence associés à un colorant, de préférence encore un colorant fluorescent sous forme de suspension à une concentration permettant leur visualisation après dépôt à 10 l'aide dudit colorant, et permettant ainsi de vérifier la fixation des dits antigènes sur ledit support solide.

28. Méthode selon la revendication 27, caractérisée en ce que l'on dépose de façon robotisée un dit antigène microbien et, le cas échéant, un dit deuxième antigène de contrôle et, le cas échéant, un dit quatrième 15 antigène de contrôle, sous forme de suspension de corpuscules de cellules non confluentes, virus entiers ou bactéries entières ou fractions de cellules ou bactéries.

29. Méthode selon la revendication 28, caractérisée en ce que les antigènes de contrôle sous forme de suspension de cellules sont calibrés à 20 une concentration de 10^7 à 10^9 cellules/ml, lesdits antigènes de contrôle ou antigènes microbiens sous forme de suspensions de bactéries ou fractions de bactéries sont calibrés à une concentration de 10^7 à 10^9 particules/ml et les suspensions de virus entiers à une concentration de 10^9 à 10^{10} particules/ml.

25 30. Méthode selon l'une des revendications 28 ou 29, caractérisée en ce que l'on dépose lesdits antigènes de contrôle et microbiens corpusculaires en mélange avec un liant protéique, stabilisant la fixation sur ledit support solide.

31. Méthode selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit 30 liant protéique est choisi parmi du jaune d'œufs, de la gélatine, de

l'albumine de sérum de bovin ou une IgG polyclonale non humaine, de préférence de chèvre.

32. Méthode selon la revendication 31, caractérisée en ce que ledit antigène microbien corpusculaire est déposé sur ledit support solide 5 constitué d'une lame de verre, en mélange avec une immunoglobuline de type IgG polyclonale de chèvre.

33. Méthode selon l'une des revendications 27 à 32, caractérisée en ce que l'on réalise un lavage préalable dudit support dudit support solide avec une solution d'un mélange éthanol/acétone, de préférence à 50-10 50, puis on dépose et on stabilise la fixation des dits antigènes par adsorption physique sur ledit support solide par un traitement avec de l'alcool, de préférence méthanol ou éthanol, alcool que l'on élimine ensuite et, de préférence encore, on vérifie la fixation desdits antigènes par coloration, de préférence par un marquage fluorescent non spécifique des 15 protéines ou de l'ADN.

34. Méthode selon l'une des revendications 27 à 32, caractérisée en ce que l'on complète la fixation par adsorption physique des dits antigènes de contrôle et microbiens par un traitement de réticulation, de préférence un traitement chimique par un agent bi-fonctionnel de 20 couplage covalent.

DECLARATION SELON L'ARTICLE 19

Les revendications 1, 2, 3, 6, 14, 16, 18, 22, 23, 24 et 27 ont été modifiées de manière à surmonter les objections de manque de clarté contenues dans l'opinion écrite de l'Administration chargée de la recherche internationale.

La définition des premiers antigènes et troisièmes antigènes de contrôle à l'étape 1 de la revendication 1, a été clarifiée.

Le paragraphe 2/- de la revendication 1 a également été clarifié.

Le passage supprimé, à savoir la phrase "établissant l'absence d'anticorps nucléaire ... et le cas échéant de facteur rhumatoïdes" était surabondant au vu des paragraphes a- et d-, du paragraphe 1/- et des conditions cumulatives a- à c- du paragraphe 2/-.

Le support dans la description pour les modifications de la revendication 1, se trouve dans l'ensemble du contenu des pages 10, 11, jusqu'à la page 12, ligne 6, ainsi que page 18, ligne 15 à la page 20, ligne 2.

Dans les revendications 2 et suivantes, les limitations à certains modes préférés de réalisation ont été introduites ou les mentions des modes préférés supprimées.

La revendication 24 a été clarifiée concernant les antigènes de contrôle.
